Über die
Eiweisstoffe der Leguminosensamen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

Hohen philosophischen Facultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt am 18. November 1899

von

Karl Weiss
aus Kandel.

München 1899.
Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Über die
Eiweisstoffe der Leguminosensamen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doctorwürde

der

Hohen philosophischen Facultät

der

Kgl. Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt am 18. November 1899

von

Karl Weiss
aus Kandel.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

München 1899.
Kgl. Hof- und Universitäts-Buchdruckerei von Dr. C. Wolf & Sohn.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548324_0124

Seinen teueren Eltern

in

Liebe und Dankbarkeit

gewidmet vom

Verfasser.

Über die pflanzlichen Eiweisstoffe hat zuerst Ritthausen eingehende Untersuchungen angestellt, die in dem Werke „Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte etc., Bonn 1872“ grossenteils veröffentlicht sind. Er machte die Beobachtung, dass ein Teil dieser pflanzlichen Eiweisstoffe eine grosse Ähnlichkeit mit dem tierischen Casein habe. Da er den Phosphor als wesentlichen Bestandteil dieser Eiweisskörper auffasste, so nannte er sie Caseine.

Später bekämpfte Weyl (Pflüger's Archiv 1876, Zeitschrift f. physiol. Chemie Bd. 1) diese Ansicht. Er macht Ritthausen den Vorwurf, dass er das Lecithin nicht aus seinen Eiweisstoffen entfernt habe und infolgedessen den Phosphor als integrierenden Bestandteil seiner Eiweisskörper angäbe. Weyl machte die wichtige Beobachtung, dass ein grosser Teil der pflanzlichen Eiweisstoffe in verdünnten Salzlösungen löslich sei und durch Verdünnen mit Wasser wieder ausfalle. Diese salzlöslichen Eiweisstoffe, die Globuline, teilte er analog den animalischen Globulinen in Myosine und Vitelline.

Die in neuester Zeit erschienenen Arbeiten von Chittenden und Osborne bringen genaue Analysen möglichst gereinigter Eiweisspräparate aus den verschiedenen Samen. Auf Grund der Analysenwerte teilen sie die pflanzlichen Eiweisstoffe in eine Menge einzelner Individuen. Die Arbeiten dieser Forscher erschienen in amerikanischen Zeitschriften wie „American Chemical Journal“, „Journal of the American Chemical Society“, „Conn. Exper. Stat. Rep.“, zum Teil in dem Werke „Die Proteide der Getreidearten, Hülsenfrüchte u. s. w. Heidelberg 1897 von Dr. V. Griessmayer“ ins Deutsche übersetzt.

Die oben angeführten Autoren sind es hauptsächlich, die umfassende Untersuchungen über die pflanzlichen Eiweisstoffe angestellt haben. Ist durch diese Arbeiten auch manches Wissenswerte entdeckt worden, so liegt doch andererseits die Eiweisschemie im allgemeinen und die Wissenschaft der pflanzlichen Eiweisstoffe im besonderen noch sehr im Dunkeln.

Der ursprüngliche Zweck dieser Arbeit, welche vorgelegt wird, war, durch möglichst verdünnte Säuren einen allmählichen Abbau des Eiweissmolecüls zu veranlassen und namentlich die noch unbekannte Lücke zwischen den Peptonen und Amidosäuren auszufüllen.

Bei Herstellung eines verlässigen Ausgangsmateriales wurde auf Schwierigkeiten gestossen; zugleich tauchten Fragen auf, deren Lösung viel wichtiger erschien, so dass von dem anfänglich gestellten Thema vollständig abgegangen wurde.

Als Ausgangsmaterial wurden die gelben Lupinen gewählt, da diese sehr reich an Eiweisstoffen sind. Behufs Darstellung der Eiweisskörper wurden die Samen möglichst von den Schalen befreit, fein gepulvert und mit Äther erschöpft. Das entfettete Samenpulver wurde nach dem Verfahren von Ritthausen mit Wasser ausgezogen, dem soviel Alkali zugesetzt war, dass es dauernd schwach alkalisch reagierte. Beim Neutralisieren der geklärten Flüssigkeit fiel das Eiweiss aus und wurde gesammelt. Mit 5% Kochsalzlösung behandelt, löste es sich zum Teil darin und konnte aus der filtrierten Lösung durch Verdünnen mit Wasser als zusammenhängende, klebrige Masse gewonnen werden. Nach dem Behandeln zuerst mit verdünntem, dann mit starkem Alkohol und zuletzt mit Äther bildete dieses Globulin ein staubfeines, gelbliches Pulver. Der in Kochsalzlösung unlösliche Eiweisskörper, das Casein, wurde durch wiederholtes Auflösen in alkalischem Wasser und jedesmaliges Fällen mit Essigsäure gereinigt, alsdann mit destilliertem Wasser aus-

gewaschen und durch Behandeln mit Alkohol und Äther zur Trockene gebracht.

Das Globulin wie das Casein lieferte beim Glühen eine stark sauer reagierende Asche, die grösstenteils aus Phosphorsäure bestand. Da der Phosphorsäuregehalt nach Weyl von Verunreinigung mit Lecithin herrühren soll, so wurde versucht, dieses vollständig zu entfernen. Dass die Samen durch Behandeln mit Äther nur zum kleinen Teil von Lecithin befreit werden können, wurde schon von Schulze-Zürich (Zeitschr. f. physiol. Chem. 13.) nachgewiesen und war es daher auch wohl möglich, dass selbst auch die mit Äther erschöpften Samen noch lecithinhaltige Eiweisspräparate lieferten. Zur Entfernung des Lecithins wurde das Globulin in einen Soxhletapparat gebracht und zuerst mit Äther und dann mit absolutem Alkohol extrahiert. Sowohl der Äther- wie der Alkoholauszug enthielten Glycerinphosphorsäure und Fettsäuren; ferner konnten in den ganz zu Anfang ablaufenden Extractionsflüssigkeiten geringe Mengen von Cholin und Phytosterin nachgewiesen werden. Trotzdem 14 Tage lang beständig mit absolutem Alkohol extrahiert wurde, gingen immer noch Glycerinphosphorsäure und Fettsäuren in Lösung, so dass es unmöglich schien, auf diese Weise die Stoffe zu entfernen. Da aber Cholin und Phytosterin verhältnismässig rasch ausgewaschen waren, so konnten unmöglich die Glycerinphosphorsäure und die Fettsäuren von einer mechanischen Verunreinigung des Eiweisses stammen. Es lag vielmehr die Vermutung nahe, dass diese Stoffe von einem langsamen Zerfall von Lecithineiweissverbindungen herrührten. Schon Hoppe-Seyler fasst das Ovovitellin (Med. chem. Unters.) als eine Verbindung zwischen Eiweiss und Lecithin auf, da letzteres nicht durch Äther, sondern erst durch längeres Kochen mit Alkohol zu entfernen sei. Ebenso hat Liebermann (Pflüger's Archiv 50 und 54) lecithinhaltige Eiweisskörper als unlösliche Rückstände bei der Pepsinverdauung von Magenschleimhaut, Leber, Nieren u. s. w. erhalten. Ist aber das Globulin aus Lupinen ebenfalls ein

Lecithalbumin, wie Liebermann seine lecithinhaltigen Eiweisskörper nennt, so ist die Frage, warum das Cholin in den späteren Alkoholauszügen vollständig fehle. Die Beantwortung ist nicht schwer, wenn man die Natur des Globulins in Betracht zieht. Es hat nämlich dieses Lupinenglobulin einen ausgesprochen saueren Charakter, so dass es den basischen Bestandteil des Lecithins, das Cholin, fester zurückhält als die beiden Säuren: Glycerinphosphorsäure und Fettsäure. Um den praktischen Beweis dafür zu bringen, wurde an Stelle des absoluten Alkohols mit solchem extrahiert, in den etwas Salzsäuregas eingeleitet war. Sofort wurde eine braune Extractionsflüssigkeit erhalten, die, zur Trockene verdampft, grösstenteils in Wasser löslich war. Die Lösung gab deutliche Biuretreaction, die durch nicht unbedeutende Mengen von Albumosen hervorgerufen wurden. Zur Entfernung derselben wurde mit Tanninlösung versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand, und das Filtrat davon mit Barytwasser im Überschuss behandelt. Dabei konnte deutliche Ammoniakentwickelung constatiert werden. Es wurde filtriert und zur Beseitigung des überschüssigen Barytes Kohlensäure eingeleitet. Das Filtrat davon zur Trockene verdampft und mit absolutem Alkohol aufgenommen, gab mit alkoholischer Platinchloridlösung einen reichlichen Niederschlag. Auf dem Filter gesammelt, in Wasser gelöst und langsam eingedunstet, lieferte dieser grosse sechsseitige Tafeln von der Gestalt des Cholinplatinchlorids. Der gefundene Platingehalt 31,82 % Pt. stimmte mit dem berechneten 31,61 % auf Cholin. Dadurch, dass das Cholin erst bei tieferer Spaltung des Eiweissmolecüls gewonnen werden konnte, war bewiesen, dass Lecithin unstreitig eine chemische Verbindung mit dem Globulin eingehen muss. Ein Versuch, aus der quantitativen Bestimmung des Phosphors den Lecithingehalt des Globulines zu berechnen, führte zu dem Resultate, dass neben dem Lecithin noch andere phosphorreichere Stoffe in dem Eiweiss enthalten sein mussten; denn die Analyse ergab den hohen Gehalt von 0,7 % P_2O_5 in dem

Globulin, welcher unmöglich allein von dem phosphorarmen Lecithin herrühren konnte.

Da zum Zwecke der Peptonisation nur reines Eiweiss brauchbar war, so wurde versucht, die unbekannten Phosphorverbindungen durch starke chemische Agentien zu entfernen. Dies gelang aber nur sehr schwer und unvollkommen dadurch, dass das Globulin mit 3% Salzsäure oder 1% Salpetersäure übergossen wurde. Das darin unlösliche Proteid musste häufig umgerührt und die darüberstehende Säure öfters durch neue ersetzt werden. Auf diese Weise wurde schliesslich nach sehr langer Zeit ein Präparat erhalten, das frei von Phosphor war. Es verhielt sich also das Globulin wie ein Nuclein. Versuche aber, Nucleinbasen nachzuweisen, fielen negativ aus. Liebermann (Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21 S. 598) hat in Hefennuclein Metaphosphorsäure nachweisen können. Der Säureauszug aus dem Lupinenglobulin gibt zwar auch die gewöhnlichen Reactionen der Orthophosphorsäure erst beim Glühen mit Alkalien, doch fehlt ihm die Eiweiss fällende Reaction der Metaphosphorsäure. Der Phosphor liegt vielmehr in einer kohlenstoffhaltigen, aber stickstoffreien Verbindung vor, die wegen Mangel an Material nicht näher studiert werden konnte.

Die Untersuchung des Caseins ergab, dass es kein Lecithin, dagegen auch Nucleinphosphor enthielt. Da das Casein im Gegensatz zu dem Globulin lecithinfrei war, so glaubte ich die Ursache davon in dem Reinigungsverfahren, dem wiederholten Auflösen in Alkalien und jedesmaligen Fällen durch Neutralisation zu erblicken. Diese Methode auf das Globulin angewandt, lieferte auch thatsächlich ein lecithinfreies Präparat, doch hatte dies durch diese Behandlung vollständig seinen Globulincharakter verloren. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Lecithineiweissverbindungen durch diese eingreifenden Agentien, wie Säuren und Basen, leicht eine Spaltung erfahren, indem sie Cholin und Fettsäuren abgeben und sich in die Nucleine umlagern. Es wäre also leicht

denkbar, dass die Nucleine nichts anderes als zersetzte Lecithineiweissverbindungen darstellen.

Da sowohl Weyl als auch Osborne den Phosphor der pflanzlichen Eiweisskörper nur Verunreinigungen zuschreiben, im Gegensatz zu allen früheren Forschern, so wurde noch versucht, ob die nach ihren Angaben erhaltenen Eiweisskörper phosphorfrei wären. Nach Weyl's Vorschrift wurden die gepulverten und entfetteten Samen mit 5 % Kochsalzlösung ausgezogen und das Globulin aus diesen Auszügen durch Zusatz von Wasser gewonnen. Osborne wendet dieselbe Art der Extraction an; nur salzt er dann die Eiweisstoffe mit Ammoniumsulfat aus und gewinnt dann das Globulin durch Dialyse. Nach beiden Methoden wurde dasselbe Globulin erhalten wie nach dem von Ritthausen angegebenen Verfahren. Die Präparate von Phosphor zu befreien, war nur bei tief greifender Zersetzung des Eiweissmolecüles möglich. Die Annahme älterer Forscher, dass Phosphor ein wesentlicher Bestandteil der pflanzlichen Eiweisstoffe sei, ist somit richtig.

Die weiteren Eigenschaften des Lupinenglobulins waren folgende: Unlöslichkeit in Wasser; dagegen Löslichkeit in verdünnten Salzlösungen. Durch Chlornatrium kann daraus das Eiweiss nicht ausgesalzen werden, wohl aber vollständig durch Ammoniumsulfat. Das Globulin, in 5% Kochsalzlösung gelöst, fing von 75° an Niederschläge abzuscheiden; doch war die Coagulation selbst bei längerem Sieden der Flüssigkeit sehr unvollständig, indem der grösste Teil des Globulins aus dem Filtrate unverändert zurückerhalten wurde. Die Biuretreaction des Globulins fällt rot aus wie bei Albumosen. Ausser in Salzlösungen ist das Globulin in Alkalien, Alkalicarbonaten und sehr verdünnten Säuren löslich und fällt beim Neutralisieren wieder aus. Salzsäure 0,4 % löst das Globulin besonders rasch; fügt man aber stärkere Salzsäure hinzu, so fällt das Eiweiss bei einem Gehalte von 3 % HCl in schneeweissen Flocken aus. Ebenso bringen andere starke Säuren das Eiweiss zur Ausscheidung. Dieses so durch Säuren aus-

geschiedene Proteid versprach einen ganz besonderen Grad der Reinheit zu besitzen und für die anfangs geplanten Zwecke der Peptonisation sehr geeignet. Es wurde in Wasser gelöst, durch Neutralisation wieder ausgeschieden und einer nähern Untersuchung unterzogen. Anzunehmen war, dass das Globulin durch Einwirkung der Säuren in ein Acidalbumin umgewandelt wurde, und folgende Eigenschaften schienen auch das zu bestätigen. Es war unlöslich in Wasser und Salzlösungen, leicht löslich aber in Alkalien, Alkalicarbonaten und verdünnten Säuren. Die Biuretreaction fiel intensiv violett aus. Auffallend war die stark sauere Reaction des Eiweisses gegen Lacmus. Es musste daher geprüft werden, ob das vermeintliche Acidalbumin nicht vielleicht ein Albuminat sei. Die verschiedenen Prüfungen nach Mörner (Pflüger's Archiv 1878) ergaben auch thatsächlich den Albuminatcharakter des Eiweisses. Es ist daher dieser Fall eine Ausnahme von der Regel, dass sich Albuminate durch Einwirkung von Alkalien, Acidalbumine durch Einwirkung von Säuren aus den nativen Eiweisskörpern bilden. Die Caseine unterscheiden sich von den Albuminaten nur durch den Phosphorgehalt. Da das aus dem Globulin erhaltene Albuminat stark phosphorhaltig war und in seinem ganzen Verhalten dem tierischen Casein glich, so hat man die grösste Berechtigung, auch dieses Albuminat zu den Caseinen zu rechnen. Dieses künstlich durch Säuren aus dem Globulin abgeschiedene Casein war vollständig identisch mit dem direct aus den Samen erhaltenen Casein.

Nachdem die Umwandlung des Globulins in das Casein constatiert war, drängte sich die Frage auf, wie wohl diese Veränderung vor sich gehe. Dies schien zwar eine unlösbare Aufgabe, doch fand sich bald ein Anhaltspunkt, als die mit 3% Salzsäure behandelte und von dem ausgeschiedenen Casein abfiltrierte Globulinlösung näher untersucht wurde. Diese gab intensive Rotfärbung mit alkalischer Kupferlösung. Es waren also noch Eiweisstoffe in der 3% Salzsäure gelöst geblieben. Diese wurden mit Ammoniumsulfat ausgesalzen.

Das ausgeschiedene Eiweiss wurde in laufendem Wasser salzfrei dialysiert und konnte wie das Globulin als eine zusammenhängende, klebrige Masse gewonnen werden. Bei der Dialysation wurde die Beobachtung gemacht, dass dieses Eiweiss sehr rasch durch Pergamentpapier diffundierte, indem selbst bei Anwendung von sehr dickem Pergament die äusseren Gefässe, in denen der Dialysator stand, bedeutende Mengen von ausgeschiedenem Eiweiss enthielten. Folgende Methode führte schneller zum Ziele und ergab eine bessere Ausbeute an diesem Eiweiss. Die von dem ausgeschiedenen Casein abfiltrierte, stark salzsaure Lösung wurde direct in fliessendem Wasser dialysiert. Nach Verlauf eines Tages war der grösste Teil der Salzsäure entfernt. Der Rest wurde jetzt durch Soda abgestumpft; dabei fiel das Eiweiss wieder als zusammenhängende Masse aus. Es wurde mit destilliertem Wasser durchgeknetet und trocknete an der Luft rasch zu einem durchsichtigen, leicht zerreiblichen Glase ein. Die Ähnlichkeit mit dem Globulin, aus dem es erhalten wurde, ist so gross, dass es leicht mit diesem verwechselt werden kann. Es löst sich in Alkalien, Alkalicarbonaten und Salzlösungen. Aus letzteren wird es durch Verdünnen mit Wasser wieder ausgefällt. In Säuren ist dieser Eiweisskörper namentlich leicht löslich, auch in Salzsäure jeder Concentration. Gefällt wird er von Ferrocyanwasserstoffsäure und stärkerer Salpetersäure. Diese Niederschläge verschwinden beim Erwärmen und kommen beim Erkalten wieder zum Vorschein. Die Concentration der Säure und der Albumose sind dabei entscheidend für die Temperatur, bei welcher das Eiweiss beim Erwärmen sich löst und beim Abkühlen sich wieder ausscheidet. Dieses Proteid in Salzlösungen gelöst, coaguliert nicht beim Erwärmen. Durch Chlornatrium wird es nicht ausgesalzen, wohl aber durch Ammoniumsulfat. Der Eiweisskörper kann aus seinen Lösungen in Alkalien oder Säuren durch Neutralisation und darauffolgende Dialyse wieder unverändert zurückerhalten werden. Sehr merkwürdig ist der Umstand, dass sowohl

Millon's Probe wie Adamkiewicz's Reaction mit diesem Eiweisskörper keine Färbungserscheinungen hervorrufen. Hat dieses Proteid auch sehr grosse Ähnlichkeit mit dem Globulin, aus welchem es dargestellt wurde, so unterscheidet es sich doch namentlich durch das Verhalten gegen Säuren wesentlich von diesem. Der Körper hat ganz den Charakter einer Albumose und zwar steht er der von Kühne beschriebenen Heteroalbumose (Zeitschr. f. Biolog. 1884) am nächsten. Allerdings zeigt diese Albumose von der Heteroalbumose Kühne's die Abweichung, beim Sieden nicht zu coagulieren und auf diese Art die Dysalbumose zu bilden; trocknet man aber die aus Lupinen dargestellte Albumose bei 105°, so erhält man auch ein der Dysalbumose ähnliches Umwandlungsproduct. Der Unterschied zwischen Kühne's Heteroalbumose und der von mir dargestellten Albumose ist so gering, dass es unnötig erscheint, diese mit einem besonderen Namen zu belegen.

Ich werde daher in der folgenden Arbeit diese pflanzliche Albumose immer als Heteroalbumose bezeichnen.

Das Globulin war also durch die Einwirkung der Salzsäure in Casein und Heteroalbumose gespalten worden. Ebenso zersetzend wirken alle andern Säuren mit Ausnahme der sehr schwachen, wie Kohlensäure.

Sehr interessant und wichtig für das Wesen der Coagulation ist, dass Erhitzen des in Salzlösungen gelösten Globulins dieselbe Veränderung hervorbringt wie die Säuren. Untersucht man nämlich die durch Kochen erzeugten Coagulationen, so findet man, dass diese weiter nichts sind als reines Casein, während in dem Filtrate davon neben unverändertem Globulin die Heteroalbumose vorhanden ist. Kocht man allerdings sehr lange, so kann das ausgeschiedene Casein in Säuren und Alkalien unlöslich werden und sich dann wie coaguliertes Eiweiss verhalten. Ebenso wird auch schon durch längere Berührung mit kaltem Wasser das Casein zuerst in Säuren und dann auch in Alkalien unlöslich. Sehr wichtig ist, dass

das Casein bei keiner bestimmten Temperatur sich ausscheidet; denn erhitzt man eine Globulinlösung längere Zeit constant bei 75°, filtriert vom Niederschlage ab und erhitzt nun wieder, so wird oberhalb 75° die Eiweisslösung wieder trübe. Hält man nun die Temperatur constant auf 80°, filtriert wieder und erwärmt von neuem, so treten jetzt die Trübungen erst oberhalb 80° ein. Auf diese Weise kann man fortfahren und mehrere bei ganz verschiedenen Temperaturen ausgeschiedene Caseine erhalten, die sich aber von einander in nichts unterscheiden. Keineswegs ist aber bei 100° eine vollständige Zersetzung des Globulins in Casein und Heteroalbumose eingetreten; denn bei Zusatz von Salzsäure finden noch bedeutende Ausscheidungen von Casein statt.

Ausser Säuren und Siedehitze wirkt auch schon längeres Verweilen unter Wasser zum Teil spaltend auf das Globulin. Während sehr starke Kalilauge ebenfalls sofortige Spaltung des Globulins bewirkt, ist der Umstand von grosser Bedeutung, dass das Globulin in verdünnten Alkalien unverändert löslich ist; denn als es in 1% Kalilauge gelöst und dann dialysiert wurde, schied es sich ohne die geringste Bildung von Casein in allen seinen früheren Eigenschaften wieder aus. Mit Rücksicht darauf kann man die Globuline auch auf die Weise gewinnen, dass man die gepulverten Samen mit schwach alkalischem Wasser auszieht und hierauf das Eiweiss durch Dialyse ausscheidet. Diese Methode bietet überhaupt die grösste Wahrscheinlichkeit, nur genuines Eiweiss zu erhalten; denn da hauptsächlich Säuren die Veränderungen des Globulines hervorbringen, so können die damit zugleich aus den Samen extrahierten organischen Säuren und saueren Phosphate nicht schädlich auf das gelöste Proteid einwirken; allerdings hat diese Methode die Schattenseite, dass erstens sehr viele schleimige Stoffe durch die Alkalien ausgezogen werden, die dann das Eiweiss verunreinigen, und dass zweitens alkalisch reagierende Eiweisslösungen sehr rasch der Zersetzung durch Bakterien anheimfallen.

Ritthausen und die älteren Forscher, die die Samen mit alkalischem Wasser auszogen und das Eiweiss durch Neutralisation mit Säuren wieder ausfällten, konnten nur unreine Präparate erhalten, die hauptsächlich Casein und nur wenig unverändertes Globulin enthielten. Nach Weyl's Verfahren erhält man schon sehr viel Globulin, das aber mit freier Heteroalbumose verunreinigt ist; denn da Weyl nicht die natürlichen Pflanzensäuren neutralisieren lässt, so muss sich immer noch ein Teil des Globulins zersetzen. Auch Osborne hat zu wenig Rücksicht auf die Abstumpfung der vorhandenen Pflanzensäuren genommen. Ausserdem ist das von ihm angewandte Aussalzen mit Ammoniumsulfat nicht ganz indifferent auf die genuinen Eiweisstoffe. Namentlich scheinen durch diese Manipulation die so hoch gefundenen Stickstoffwerte von einem Austausch anorganischer Basen des Eiweisses gegen Ammoniak herzurühren.

Ich habe daher meine Eiweisskörper nach folgendem Verfahren dargestellt: Die gepulverten Samen werden mit einer genügenden Menge Magnesiumcarbonat versetzt und mit dem sechsfachen Gewicht einer 5% Kochsalzlösung übergossen. Es wird öfters umgerührt, nach 12 Stunden gepresst und der Rückstand nochmals mit der vierfachen Menge Kochsalzlösung ausgezogen. Nach weiteren 12 Stunden wird wieder abgepresst und die beiden Auszüge nach dem Absitzen filtriert. Die klaren Filtrate werden im laufenden Wasser dialysiert und das ausgeschiedene Eiweiss durch Behandeln mit Alkohol und Äther getrocknet. Zur Verhütung von Fäulnis ist es zweckmässig, den Eiweisslösungen einige Tropfen Chloroform zuzusetzen. Dieses Verfahren, das zersetzende Einflüsse möglichst ferne hält, bietet die meiste Garantie, schnell verlässige Präparate zu erhalten. So war auch das auf diese Weise aus Lupinen gewonnene Globulin anscheinend frei von Heteroalbumose; denn bei vorsichtiger Anwendung des Alkalis fiel die Biuretreaction zuerst negativ aus und erst beim längeren Stehen oder beim Erwärmen trat intensive Rotfärbung ein. Die nach

den früheren Verfahren dargestellten Globuline sowie reine Heteroalbumose geben sofort die Biuretreaction. Diesen Unterschied kann man nur so erklären, dass reines Globulin überhaupt nicht die Biuretreaction gibt, sondern erst, wenn es in seine beiden Componenten, Casein und Heteroalbumose, gespalten wird. Die leichte Spaltbarkeit des Globulins in Casein und Heteroalbumose, sowie die grosse Ähnlichkeit in Bezug auf ihre Löslichkeitsverhältnisse erklärt die Schwierigkeit, ein mit freier Heteroalbumose nicht verunreinigtes Globulin zu erhalten.

Nachdem es anscheinend gelungen war, ein reines Globulin darzustellen, glaubte ich, auch dessen Elementaranalyse ausführen zu müssen, zudem ja namentlich Osborne den Schwerpunkt bei seinen Arbeiten auf die Elementaranalyse gelegt hat. Es schien namentlich ein Vergleich der Analyse des Globulins mit denen des Caseins und der Heteroalbumose wichtig. Daher wurden von diesen drei Eiweisskörpern möglichst sorgfältig gereinigte Präparate dargestellt. Bei Ausführung der Analysen wurde die Beobachtung gemacht, dass die Temperatur, bei welcher das Eiweiss getrocknet wurde, sowie die Länge des darauffolgenden Liegens im Exsiccator einen bedeutenden Einfluss auf das Gewicht hervorrief. Die Eiweisskörper nahmen im Exsiccator während mehrerer Tage fortwährend an Gewicht zu. Es war dabei ganz gleichgiltig, welches Trockenmittel dabei in Anwendung kam. Folgender Versuch gab Aufklärung für dieses Verhalten. Eine Portion Eiweiss wurde auf zwei Uhrgläser zu gleichen Teilen verteilt und eine halbe Stunde bei 105° getrocknet. Alsdann wurde das eine Uhrglas in einen Exsiccator gebracht, der mit Kohlensäure gefüllt war, das andere in einen solchen, der gewöhnliche Luft enthielt. Nach einer halben Stunde wurden beide Uhrgläser auf die Wage gebracht. Nachdem sie noch 10 Minuten in dem Wagenkasten gestanden hatten, wurde das Gewicht festgestellt. Dabei zeigte das in der Kohlensäureatmosphäre erkaltete Eiweiss ein viel höheres

Gewicht an als das andere. Es lässt sich dieser Befund nur dadurch erklären, dass die Eiweisskörper Gase absorbieren, ähnlich wie Holzkohle. Wenn dies auch lange nicht in dem Maasse erfolgt wie bei dieser, so gibt es doch immerhin zu Analysenfehlern Anlass. Wenn man nun ferner noch die Schwierigkeit in Betracht zieht, mit der überhaupt reine und zuverlässige Eiweisstoffe zu erhalten sind, so glaube ich den Elementaranalysen als ein Hauptcriterium für die Beurteilung der Proteide besondereren Wert absprechen zu müssen. Es ist daher auch leicht erklärlich, warum die von verschiedenen Autoren untersuchten Eiweisskörper selbst bei völliger Übereinstimmung ihrer sonstigen Eigenschaften selten übereinstimmende Analysenwerte ergeben haben. Von diesem Standpunkt aus möge man auch die folgenden Analysenwerte nur als orientierende Zahlen betrachten, die aber trotz ihres geringen Anspruches auf absolute Genauigkeit wichtige Unterscheidungsmerkmale zeigen.

Bei der Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes wurde die Substanz mit Bleichromat verbrannt, während bei der Stickstoffbestimmung nach Dumas Kupferoxyd in Anwendung kam. Zur Bestimmung des Schwefels und des Phosphors wurde das Eiweiss im Platintiegel bei Gegenwart von Soda verbrannt. Der Schwefel wurde als $BaSO_4$ zur Wägung gebracht. Die Phosphorsäure wurde zuerst aus salpetersaurer Lösung durch Ammoniummolybdänat unter bekannten Vorsichtsmassregeln abgeschieden, der Niederschlag in Ammoniak gelöst, durch Magnesiamischung wieder gefällt und als $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

Die Analysen ergaben folgende Zahlen:

I. Globulin.

Kohlenstoff	= 51,1%
Wasserstoff	= 6,9%
Stickstoff	= 17,6%
Schwefel	= 0,5%
Phosphorsäure (P_2O_5)	= 0,7%

Calciumoxyd	0,12	
Magnesiumoxyd	0,13	Asche = 0,4%
Ferrioxyd	0,07	
Unbestimmte Subst.	0,06	

Sauerstoff = 22,8%

	II. Casein.	III. Heteroalbumose.
Kohlenstoff	= 51,9%	49,2%
Wasserstoff	= 7,1%	7,0%
Stickstoff	= 16,4%	18,2%
Schwefel	= 0,8%	0,4%
Phosphors.	= 0,3%	0,7%
Sauerstoff	= 23,5%	24,5%

Der Vergleich der Analysenwerte lässt einen grossen Gegensatz zwischen Casein und Heteroalbumose erkennen. Während die Heteroalbumose einen auffallend niedrigen Kohlenstoffgehalt und einen hohen Stickstoffgehalt zeigt, ist das Verhältnis bei Casein gerade umgekehrt. Der Phosphorgehalt des Caseins ist jedenfalls in Wirklichkeit höher, als er gefunden wurde, indem bei der Darstellung aus Globulin mit Säuren immer etwas verloren gehen muss.

Es erübrigt noch, die Pflanzenasche einer näheren Betrachtung zu unterziehen. Casein und Heteroalbumose sind als aschenfrei zu bezeichnen; denn es konnten nach dem Glühen nur Spuren von Basen nachgewiesen werden; anders dagegen das Globulin. Dieses enthielt im Aschenrückstande ausser Phosphorsäure und Schwefelsäure eine bedeutende Menge Calcium-, Magnesium- und Eisen-Oxyd, die quantitativ bestimmt wurden. Es konnten qualitativ aber noch andere Stoffe, wie Kieselsäure, Mangan und Alkalimetalle, nachgewiesen werden. Da die Streitfrage noch nicht erledigt ist, ob die Asche der Eiweisskörper eine Verunreinigung oder ein wesentlicher Bestandteil davon ist, so suchte ich dies an dem pflanzlichen Globulin zu entscheiden. Löst man dieses in

reiner Chlornatriumlösung auf und dialysiert gegen destilliertes Wasser, so scheidet es sich wieder unverändert in Bezug auf seine Aschenbestandteile aus. Man kann dieses Auflösen und Ausscheiden durch Dialyse noch so oft wiederholen, ohne dadurch irgend welche Verminderung des Calcium oder des Magnesiumgehaltes zu erreichen; ebensowenig konnte auch in der äusseren Diffusionsflüssigkeit jemals eine Spur dieser Basen nachgewiesen werden. Löst man aber eine bestimmte Menge reinen Globulins in 3% Kochsalzlösung und setzt eine den Basen der Eiweissasche äquivalente Menge Salzsäure vorsichtig hinzu, so fällt in dem Maasse, wie die Säure hinzukommt, das Eiweiss aus. Bei Zusatz weiterer Mengen Salzsäure geht das ausgeschiedene Eiweiss wieder in Lösung. Dialysiert man jetzt die von dem ausgeschiedenen Eiweiss abgegossene Lösung, so kann man deutlich die Basen in dem äusseren Dialysationswasser nachweisen. Zugleich wird aber durch diese geringe Menge Säure das ursprüngliche Globulin in Casein und Heteroalbumose gespalten. Da diese letzten beiden Eiweisskörper aschenfrei zu erhalten sind, während ein Entfernen der Basen aus dem Globulin mit einem Zerfall dieses Eiweissmolecüles zusammenhängt, so ist es zweifellos, dass die Asche des Globulins keine Verunreinigung, sondern einen wichtigen Bestandteil davon ausmacht. Man muss also das Globulin als eine salzartige Verbindung zwischen einem Eiweiss von sauerem Charakter und den in der Asche enthaltenen Basen auffassen. Die Verbindung entspricht einem saueren Salz; denn Globulin reagiert gegen Lacmus entschieden sauer. Versuche, aus Casein und Heteroalbumose und den in den Aschen enthaltenen Basen das ursprüngliche Globulin darzustellen, schlugen zwar fehl, doch kann dies nicht als Gegenbeweis gegen obige Behauptung gelten; kommen doch in der Chemie oft solche Fälle vor, dass eine Säure nur in Salzen bekannt ist und in dem Momente, in welchem sie in Freiheit gesetzt wird, zerfällt. Man muss also auch in unserem Falle annehmen, dass der von seinen Basen befreite

labile Eiweisskörper sich sofort in seine beiden stabileren Componenten, Casein und Heteroalbumose, umlagert. Jetzt ist es auch erklärlich, warum das Globulin von verdünnten Alkalilösungen nicht verändert wird. Das Globulin ist also an und für sich kein so unbeständiger Körper, wenn man bei der Handhabung damit nur dafür sorgt, dass auf keine Weise Basen verloren gehen.

Stellt das Globulin aus Lupinen einen vollständig einheitlichen Eiweisskörper dar, oder ist es vielleicht ein Gemisch mehrerer ähnlicher Körper? Der Zweifel über die Einheitlichkeit war schon deshalb berechtigt, weil bei den früheren Versuchen sich herausstellte, dass das Globulin bei keiner bestimmten Temperatur coagulierte, sondern, von etwa 70° ansteigend, bei jeder Temperatur Ausscheidungen von Casein stattfanden. Eine Entscheidung dieser Frage schien durch fractionierte Fällungen oder durch fractionierte Dialysen einer grossen Menge reinen Globulines möglich. Zu diesem Zwecke wurden 500 gr davon in 5% Kochsalzlösung gelöst und mit destilliertem Wasser verdünnt, bis der Gehalt an Kochsalz auf 1¾% gesunken war. Der Niederschlag I setzte sich nach einiger Zeit ab, so dass das Gelöste leicht zu filtrieren war. Zu dem Filtrat wurde nun weiter Wasser gefügt, bis der Gehalt an Kochsalz noch 1% betrug. Der dadurch entstandene II. Niederschlag wurde von der Flüssigkeit getrennt und letztere wiederum mit Wasser bis zu einem Gehalt an Kochsalz von ½% verdünnt. Es entstand wieder ein Niederschlag III. Die davon abfiltrierte Flüssigkeit gab zwar noch geringe Ausscheidungen bei weiterem Verdünnen mit Wasser, doch war infolge der ungeheueren Flüssigkeitsmasse keine Ausbeute zu erhalten. Jedoch wurden aus Lupinenauszügen die Anteile, die sich bei der Dialyse zuletzt ausgeschieden hatten, gesondert gesammelt und entsprachen in Löslichkeitsverhältnissen einer Fraction IV. In Niederschlag I und II war der grösste Teil des angewandten Eiweisses wieder gewonnen worden. Die einzelnen Niederschläge wurden nun noch mehrere Mal

durchfractioniert, so dass man schliesslich vier Fractionen mit verschiedenen Löslichkeitsverhältnissen in Händen hatte.

Fraction I und II war gelb und von zäher Consistenz; Fraction IV dagegen sah weiss und flockig aus. In Bezug auf die Coagulation beim Erwärmen besassen die einzelnen Fractionen merkliche Unterschiede. Während eine Salzlösung mit Fraction I selbst beim Sieden keine Ausscheidungen gab, war dies mit Fraction II schon nachweisbar. Fraction III lieferte schon bei 80° Caseinniederschläge, und Fraction IV wurde schon bei 75° vollständig zersetzt. Den auffallendsten Unterschied zwischen den vier Fractionen bildete ihr relativer Gehalt an Casein und Heteroalbumose. Dieser war leicht auf folgende Weise zu bestimmen. Es wurden je 1,5—2,0 gr der vier Fractionen noch im feuchten Zustande in 0,4 % Salzsäure aufgelöst. Aus diesen Lösungen wurde durch stärkere Salzsäure das Casein ausgeschieden, abfiltriert und noch mehrere Mal mit 3% Salzsäure ausgewaschen. Hierauf wurde der Stickstoffgehalt des Caseinniederschlages wie des Filtrates nach Kjeldahl ermittelt. Der gefundene Gehalt an Stickstoff mit dem entsprechenden Coefficienten für Casein 6,1, für Heteroalbumose 5,49 multipliciert, ergab die relative Menge der beiden Eiweisskörper. Da durch 3% Salzsäure dem Casein kein Stickstoff entzogen wird, so gibt die Methode übereinstimmende Zahlen:

Fraction	I	lieferte	55	Teile	Casein	auf	45	Teile Heteroalb.
„	II	„	59	„	„	„	41	„ „
„	III	„	66	„	„	„	34	„ „
„	IV	„	80	„	„	„	20	„ „

Diese Zahlen beweisen, dass das Globulin kein einheitliches Proteid sein kann, sondern ein Gemisch mehrerer einander sehr ähnlicher Globuline darstellt. Die schwerer löslichen Anteile sind reicher an Heteroalbumose und ihr Verhalten ist ganz das der Vitelline; während die leichter löslichen Bestandteile arm an Heteroalbumose sind und in ihrem Verhalten mehr zu den Myosinen hinneigen.

Wie die Erfahrung lehrt, bleibt bei noch so langem Dialysieren der Pflanzenauszüge ein Teil des Eiweisses gelöst. Diese leicht löslichen Anteile nannte man die pflanzlichen Albumine. Diese werden daran leicht erkannt, dass sie beim Erwärmen coagulieren. Bei der Untersuchung dieser Coagulate stellte sich heraus, dass dieselben auch weiter nichts sind als Caseine, wie sie auch aus den Globulinen gewonnen wurden. Die Versuche, auch Heteroalbumose in diesen Albuminlösungen nachzuweisen, fielen vollständig negativ aus. Nach dem Sieden und Abfiltrieren des Caseins waren in den Auszügen nur noch Spuren von Eiweisskörpern nachweisbar, die von Peptonen herrührten.

Es waren also die Globuline mit den Albuminen nahe verwandt. Die Frage war nun aber auch wieder, wie wohl die leichte Umsetzung von Albumin zu Casein vor sich gehe. Diese Umwandlung beruht ebenfalls wie bei Globulin auf dem Entziehen von Basen; denn wendet man denselben Versuch, wie vorher, auch auf die Albuminlösung an, indem man mit Spuren von Säuren versetzt, so fällt das Albumin als Casein aus. Der geringste Überschuss an Säuren löst den Eiweissniederschlag wieder auf. Dialysiert man nun die Flüssigkeit gegen destilliertes Wasser, so kann man deutlich Calcium und Magnesium in dem äusseren Dialysationswasser nachweisen, während vorher absolut keine anorganischen Bestandteile mehr dialysierten.

Ob allerdings nicht auch organische Stoffe wie Lecithin einen Einfluss auf die leichte Löslichkeit dieser Eiweisstoffe ausüben, ist schwer zu entscheiden. Die Albumine sind aufzufassen als salzartige Verbindungen zwischen den Basen, die ganz oder zum Teil anorganischer Natur sind und einem Eiweisskörper von sauerem Charakter, der, von den Basen befreit, Casein darstellt. Wenn eine Auflösung von Casein in anorganischen Basen keinem Albumin in allen seinen Eigenschaften entspricht, so beweist dies wie bei Globulin, dass der von den Basen befreite labile Eiweisskörper sofort eine stabilere

Form annimmt, so dass Albumin nicht mehr künstlich zu regenerieren ist. In dem Albumin erblicken wir zugleich das Endglied einer Mischungsreihe, deren Anfangsglied die Heteroalbumose ist und deren Zwischenglieder Globuline in unbestimmbarer Zahl zum Teil durch die einzelnen Fractionen repräsentiert werden.

Die folgende Tabelle bringt diesen Übergang von Heteroalbumose bis zu Albumin in übersichtlicher Form.

Löslichkeit	Heteroalbumose	Globuline				Albumin
		Fraction I.	II.	III.	IV.	
in Salzlösungen und Wasser.	Nur in Salzlösungen von mindestens 2% Na Cl löslich	Nur in Salzlösungen von mindestens 1 3/4 % lösl.	Nur in Salzlösungen von mindestens 1 % lösl.	Nur in Salzlösungen von mindestens 0,5 % lösl.	In Salzlösungen von weniger als 0,5 % lösl.	In Salzlösungen und Wasser löslich.
Die bei der Zerlegung gefundenen Mengen von Heteroalbumose zu Casein	100 : 0	45 : 55	41 : 59	34 : 66	20 : 80	0 : 100
Kohlenstoffgehalt	49,2 %	—	51,2 %	—	—	51,9 %
Stickstoffgehalt	18,2 %	17,8 %	17,6 %	17,2 %	—	16,4 %
Coagulation beim Erwärmen	nicht	nicht	geringe Ausscheidung beim Sieden	Ausscheidungen von 80° an	Vollständige Coagulation bei 75°	Trübungen bei 65° Ausscheidungen von 70° an
Biuretreaction	rot	rot	rot	violettrot	violett	violett
Millons Reagens	nicht	deutlich	sehr deutlich	intensiv	intensiv	intensiv

Da Casein und Heteroalbumose so sehr in ihrem ganzen Verhalten auseinandergingen und grundlegend für die Charakteristik der pflanzlichen Proteide waren, so war auch zu erwarten, dass ihre Zersetzungsproducte grosse Unterschiede zeigten. Namentlich schien wichtig, die basischen Zersetzungsproducte dieser Eiweisskörper näher kennen zu lernen, da die neuere Eiweisschemie von ihnen wichtige Fragen abhängig macht.

Zum Zwecke der Zersetzung mit Säuren wurden grössere Mengen beider Eiweisskörper hergestellt. 500 gr Casein kochte man unter Zugabe von etwas Zinnchlorür 96 Stunden mit 20% Salzsäure am Rückflusskühler. Die schwach gelb gefärbte Flüssigkeit wurde alsdann mit der zehnfachen Menge Wasser verdünnt und das Zinn durch Schwefelwasserstoff ausgefällt. Die Flüssigkeit wurde abfiltriert, auf etwa den fünften Teil eingedampft und in der Kälte mit soviel Phosphorwolframsäure versetzt, als noch ein Niederschlag damit entstand. Dazu waren sehr grosse Mengen Phosphorwolframsäure erforderlich und der Niederschlag nahm ein sehr grosses Volumen ein. Um ihn mehr krystallinisch zu erhalten, wurde nochmals erwärmt, wobei sich fast alles wieder löste. Die Flüssigkeit wurde langsam erkalten lassen, einige Tage in den Eisschrank gestellt und dann filtriert. Der Niederschlag wurde ausgepresst und solange mit 5% Schwefelsäure behandelt, bis die Salzsäure daraus entfernt war. Den Phosphorwolframsäureniederschlag löste man in warmem Wasser und versetzte mit Baryumhydroxyd im Überschuss. Nachdem das sich entwickelnde Ammoniak verjagt war, wurde vom Niederschlag abfiltriert und der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure entfernt. Die vom Baryt befreite Lösung sollte nun die organischen Basen enthalten. Diese wurden nach Kossel's Vorschrift (Zeitschr. f. physiol. Chemie 25) isoliert und identificiert. Zu dem Zwecke versetzte man die Flüssigkeit mit Quecksilberchlorid. Nach längerem Stehen wurde filtriert, der Nieder-

schlag in Wasser suspendiert und durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit. Das Filtrat von Quecksilbersulfid sollte das Hystidinchlorhydrat enthalten. Es wollte lange nicht gelingen, aus dem eingedickten Sirup selbst nach wiederholten Reinigungsversuchen dieses zu erhalten. Erst nach mehrmonatlichem Stehen kam es unerwartet zum Krystallisieren, allerdings in geringer Menge, etwa 0,5. Das Filtrat von dem durch Quecksilberchlorid erzeugten Niederschlag wurde nun nach Entfernen des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff auf Arginin verarbeitet, indem man der heissen Flüssigkeit Silbersulfat im Überschuss zusetzte und in das wieder erkaltete Filtrat Barytwasser goss, bis kein Niederschlag mehr dadurch erzeugt wurde. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Schwefelwasserstoff behandelt und das Filtrat eingedampft. Aus dem eingedickten Sirup schied sich bald eine grössere Menge Krystalle ab, die nach mehrmaligem Umkrystallisieren als Arginin erkannt wurden. Das Filtrat von Argininsilber sollte Lysin enthalten. Auch diese Base konnte nach Kossel als Pikrat gefällt und nach dem Umkrystallisieren aus dem Stickstoffgehalt die Identität festgestellt werden. Die Ausbeute an dieser Base war auch sehr gering, kaum 1,0. Nachdem die drei bekannten Basen in den Zersetzungsproducten des Caseins nachgewiesen waren und weitere Versuche, noch andere krystallinische Substanzen aus den Sirupen zu erhalten, negativ ausfielen, wurden die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Anteile der Zersetzungsproducte untersucht.

Das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag wurde zur Entfernung der Phosphorwolframsäure mit Baryumhydroxyd behandelt, filtriert und der überschüssige Baryt genau mit Schwefelsäure ausgefällt. Die Amidosäuren wurden nun nach dem bewährten Verfahren von Habermann und Hlasiwetz (Annal. d. Chem. u. Pharm. 169) isoliert.

Die salzsauere Lösung der Amidosäuren wurde eingedampft. Aus dem eingedickten Sirup waren aber nur sehr geringe

Mengen von dem salzsaueren Salz der Glutaminsäure zu gewinnen. Das Gemisch der Amidosäuren wurde nun von der Salzsäure befreit und auf Tyrosin verarbeitet. Dieses hatte sich nach längerem Stehen im Eisschrank in grossen Drusen aus der Flüssigkeit ausgeschieden. Letztere wurde abgegossen und eingedampft, bis sich Krystallhäute auf der Oberfläche zeigten. Bei längerem Stehen hatte sich eine Menge einer krümelichen Masse ausgeschieden. Diese bestand grösstenteils aus Leucin und Phenylalanin. Nachdem diese möglichst sorgfältig von der Mutterlauge befreit waren, wurden sie nach dem von Schultze-Zürich (Ber. d. Chem. Ges. 16. S. 1713) angegebenen Verfahren durch fractionierte Fällung ihrer Kupfersalze zu trennen gesucht. Es führte dieses Verfahren aber nur langsam und unvollkommen zum Ziele, so dass es sehr schwierig war, für Analysen brauchbare Präparate zu erhalten; doch stimmten die Reactionen vollständig auf Leucin und Phenylalanin. Aus den Mutterlaugen dieser Amidosäuren wurde Asparaginsäure isoliert und noch geringe Mengen von Leucin und Glutaminsäure gewonnen. Weiter war ausser anorganischer Salze keine krystallisierende Substanz mehr zu erhalten.

Nachdem die einzelnen Zersetzungsproducte des Caseins isoliert waren, wurde die Heteroalbumose in Arbeit genommen, von der 230 gr zur Verfügung standen. Obwohl Versuche lehrten, dass dieses Proteid auch ohne Zinnchlorür beim Kochen mit Säuren klare Lösungen gibt, so wurde doch, um gleiche Versuchsbedingungen zu haben, unter Zusatz dieses Salzes gekocht. Die Zersetzungsproducte wurden genau so, wie bei Casein angegeben, behandelt und dabei auch die drei Basen Histidin, Arginin und Lysin, allerdings auch nur in geringer Menge, isoliert. Anders gestaltete sich der Befund der Amidosäuren, indem beim Eindampfen der salzsaueren Lösung sich grosse Mengen Glutaminsäure ausschieden. Die zuerst erhaltenen Krystalldrusen, die beim Eindampfen der von freier Säure befreiten Lösung erhalten wurden, kennzeichneten sich

als Leucin. Alle Mühe aber, Tyrosin zu isolieren oder nachzuweisen, war vergebens. Es wurde nur noch Leucin, Phenylalanin und Asparaginsäure isoliert. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht darüber, wie viel von den Zersetzungsproducten aus 100 gr angewandten Eiweisses gewonnen wurden:

	aus 100 gr Casein	aus 100 gr Heteroalbumose
Histidin	0,1	0,15
Arginin	1,4	1,8
Lysin	0,2	0,2
Tyrosin	3,2	—
Leucin Phenylalanin	44,0	35,5
Asparaginsäure	4,1	1,6
Glutaminsäure	2,4	12,1

Diese Mengen der erhaltenen Zersetzungsproducte, die kaum etwas grösser sind als die Hälfte des angewandten Eiweisses, zeigen, dass ein grosser Teil davon bei den mangelhaften Gewinnungsmethoden verloren gegangen ist. Es mag ja allerdings zugegeben werden, dass bei sehr grosser Bemühung hätte noch ein Teil aus den Mutterlaugen isoliert werden können; jedoch die Fruchtlosigkeit einsehend, damit etwas Bestimmtes zu erreichen, veranlasste mich, davon abzusehen. Die Isolierungsmethoden sind zu ungenügend, um auch nur annäherungsweise etwas Quantitatives zu erreichen. Die Unterschiede der Zersetzungsproducte sind aber bei Casein und Heteroalbumose so gross, dass sie selbst bei den bisher angewandten Methoden auffallend in die Augen springen. Während Casein eine relativ grosse Menge Tyrosin lieferte, konnte dieser aromatische Kern nicht in der Heteroalbumose nachgewiesen werden. Diese Merkwürdigkeit der Heteroalbumose erinnert an den tierischen Leim. Da sich die Rotfärbung der Eiweisskörper mit Millon's Reagens auf den Atomcomplex des Tyrosins zurückführen lässt, so ist es auch jetzt erklärlich, warum dieses Reagens bei Heteroalbumose

versagt. Es scheint der andere aromotische Körper Phenylalanin die Rolle des Tyrosins zu vertreten. Leider lässt sich wegen der Schwierigkeit der Trennung des Phenylalanins von Leucin nichts Bestimmtes aussprechen mit Ausnahme davon, dass Casein eine etwas grössere Menge eines Gemisches dieser beiden Amidosäuren lieferte. Auffallende Unterschiede zeigten weiter die Zersetzungsproducte der beiden Eiweisskörper in Bezug auf die erhaltenen Mengen der Asparagin- und Glutaminsäure. Während die Heteroalbumose eine ganz ungewöhnlich grosse Menge Glutaminsäure lieferte, war der Gehalt an Asparaginsäure dagegen gering. Gerade das umgekehrte Verhältnis ergaben die Befunde des Caseins. So bedeutend die Zersetzungsproducte der beiden Eiweisskörper in den Amidosäuren differierten, so konnte doch kein Unterschied bei den Basen beobachtet werden. Die bisher aus den Zersetzungsproducten abgeschiedenen Basen sind abgesehen von Ammoniak: Histidin, Arginin und Lysin. Da Casein und Heteroalbumose, diese beiden heterogenen Eiweisskörper, die drei Basen lieferten, so ist dies eine Bestätigung der von Kossel aufgestellten Theorie, wonach allen Eiweisstoffen ein sogenannter „Protaminkern" zu Grunde liegen soll Um diesen Kern, der bei der Zersetzung die drei charakteristischen Basen liefert, sollen sich die anderen Atomcomplexe in der verschiedenartigsten Weise gruppieren und so die Differenz der einzelnen Eiweisskörper hervorrufen.

Da die Protaminbasen von Phosphorwolframsäure fast quantitativ ausgefällt werden, wie schon von anderer Seite nachgewiesen wurde, so lässt folgende Methode einen Einblick in die Verteilung des Stickstoffes zwischen den Basen und den Amidosäuren gewähren. 100 gr Eiweiss wurden mit 20 % Salzsäure 96 Stunden unter Zusatz von Zinnchlorür gekocht. Nach Entfernen des Zinns mit Schwefelwasserstoff wurde die Flüssigkeit auf einen Liter gebracht. Von dieser Lösung, die nun einer 10 % Eiweisslösung entsprach, wurden immer bestimmte Mengen abpipettiert und mit Phosphorwolframsäure

gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt und mit 5% Schwefelsäure quantitativ ausgewaschen. Es wurde der Stickstoff des Niederschlages, wie der des Filtrates nach Kjeldahl bestimmt. Auf diese Weise war das Verhältnis von Basen zu Amidosäure festgestellt. Von diesem Basenstickstoff musste noch der Ammoniakstickstoff in Abrechnung gebracht werden, um den Gehalt an Protaminstickstoff zu erfahren. Zur Bestimmung des Ammoniaks wurde eine grössere Menge der Zersetzungsflüssigkeit abpipettiert, mit Alkali der grösste Teil der Säuren abgestumpft und durch überschüssiges Magnesiumhydroxyd das Ammoniak in eine vorgelegte Normallösung überdestilliert. Der durch Titration ermittelte Ammoniakstickstoff wurde von dem Basenstickstoff abgezogen. Diese Methode für die beiden Proteide angewandt, ergab folgende Werte, die das Mittel mehrerer Stickstoffbestimmungen bilden.

100 gr Casein lieferte:

2,26	Ammoniakstickstoff	= 13,9%
3,04	Protaminstickstoff	= 18,8%
10,90	Amidosäurenstickstoff	= 67,3%
16,20	Gesamtstickstoff.	

100 gr Heteroalbumose lieferte:

3,27	Ammoniakstickstoff	= 18,3%
5,04	Protaminstickstoff	= 28,4%
9,54	Amidosäurenstickstoff	= 53,3%
17,85	Gesamtstickstoff.	

Da Ammoniak 82% Stickstoff, die Protaminbasen ungefähr 27% N und die Amidosäuren ungefähr 10% N enthalten, so berechnet sich

für 100 gr Casein	für 100 gr Heteroalbumose
2,7 Ammoniak	3,97 Ammoniak
11,3 Protaminbasen	18,7 Protaminbasen
109 Amidosäuren	95,4 Amidosäuren.

Der stark sauere Charakter des Caseins gibt sich also schon durch seine Zersetzungsproducte zu erkennen, indem

die basischen Bestandteile bedeutend gegen die saueren zurücktreten.

Nachdem durch möglichst eingehende Prüfungen die Eiweisskörper der gelben Lupinen klar gelegt waren, wurde auch die Erforschung der Proteide anderer Samen versucht.

Zunächst wurden die Erbsen gewählt, da diese nach früheren Autoren wesentlich von Lupinen abweichende Eiweisskörper enthalten sollten. Die Proteide wurden nach demselben Verfahren wie für Lupinen angegeben, ausgezogen und durch Dialyse abgeschieden. Nach dreitägigem Dialysieren wurde das ausgeschiedene Globulin herausgenommen und, in Kochsalz wieder gelöst, einer fractionierten Fällung unterworfen. Der Pflanzenauszug selbst blieb dagegen noch mehrere Tage im Dialysator. Es schied sich ein Proteid aus, das sich teilweise in 0,5% Kochsalzlösung löste. Der darin unlösliche Teil stellte ein pflanzliches Casein in allen seinen Eigenschaften dar. Die Auszüge liessen bei längerem Dialysieren immer nur Casein ausfallen. Diese stammte von dem Zerfall der in den Auszügen noch enthaltenen Albumine. Beim Erwärmen erhielt man schon bei 60° Ausscheidungen, die mit steigender Temperatur sich mehrten und bei 80° beendet waren. Nach dem Abfiltrieren dieser Ausscheidungen, die als Caseine erkannt wurden, waren die Filtrate frei von Proteiden mit Ausnahme von Spuren Pepton. Die einzelnen Fractionen des Globulins zeigten grosse Ähnlichkeit mit den entsprechenden Fractionen des Lupinenglobulins. Sie liessen sich mit Hilfe von Säuren sofort in Casein und Heteroalbumose spalten und zwar lieferten dabei die schwerer löslichen Fractionen mehr Heteroalbumose wie die leichter löslichen. Damit in Zusammenhang ergab sich auch von den schwerer löslichen zu den leichter löslichen Globulinen ein Steigen des Kohlenstoffgehaltes und ein Sinken des Stickstoffgehaltes. Ebenso nahm im Verhältnis der Löslichkeit eine leichtere Zersetzlichkeit beim Kochen, sowie auch bei Berührung mit Wasser zu, so dass die leicht löslichen Fractionen sich wie Myosine, die

schwer löslichen mehr wie Vitelline verhielten. Betreffs der Bedeutung des Phosphors sowie der anorganischen Basen für das Eiweiss kann hier nur wiederholt werden, was vorher für Lupineneiweiss angegeben worden ist.

Die Untersuchung ergab also, dass das Globulin der Erbsen eine Mischung homologer Glieder ist. Als das Anfangsglied dieser Reihe muss man die aus dem Globulin künstlich dargestellte Heteroalbumose und als deren Endglied das Albumin dieser Samen ansprechen. Das Wesen der Eiweisstoffe der Lupinen und der Erbsen ist also gleich; doch besteht der Unterschied, dass die Erbsen viel ärmer an Heteroalbumose sind und infolge davon ein grosser Teil der Proteide dieser Samen den Myosinen viel näher steht, wie dies bei Lupinen der Fall ist. Da also ein principieller Unterschied nicht vorhanden war, so glaubte ich, dass auch die Elementaranalysen der beiden zu Grunde liegenden Caseine und Heteroalbumosen hinlängliche Übereinstimmung zeigen müssen. Es wurden aus den Globulinen möglichst gereinigte Präparate dargestellt. Diese ergaben folgende Analysenwerte:

	1. Casein	2. Heteroalbumose
Kohlenstoff	= 53,3	49,6
Wasserstoff	= 7,2	7,0
Stickstoff	= 15,9	18,2
Schwefel	= 0,6	0,4
Phosphorsäure	= 0,2	0,4
Sauerstoff	= 22,8	24,4

Bei Vergleich dieser Analysen mit den Proteiden aus Lupinenglobulin bemerkt man eine ziemliche Übereinstimmung der Heteroalbumosen; bedeutende Differenz herrscht aber zwischen den Caseinen, indem der Kohlenstoffgehalt viel grösser, der Stickstoffgehalt aber kleiner als bei Lupinencasein gefunden wurde. Der Unterschied ist zu gross, als dass er durch die Unsicherheit bei den Elementaranalysen der Eiweisskörper allein erklärt werden könnte. Es verhalten sich eben diese beiden pflanzlichen Caseine wie die tierischen; trotz

Übereinstimmung ihrer Eigenschaften doch Differenzen in den Elementaranalysen. Osborne fand bei der Untersuchung der Erbsen fünf verschiedene Eiweisskörper: 1. Legumin, ein Globulin, das beim Erhitzen seiner Lösung nicht coaguliert; 2. Vicilin, ein bei 95—100° coagulierendes Globulin; 3. Legumelin, ein leicht coaguliert ausfallendes Proteid, von dem Osborne es zweifelhaft lässt, ob es ein Globulin oder Albumin ist; 4. Protoproteose; 5. Deuteroproteose. Die drei ersten Eiweisskörper sind keine einheitlichen Individuen, und die beiden Proteosen, die nur in Spuren zu finden sind, stellen weiter nichts als Spaltungsproducte dar, entstanden durch das lange Dialysieren.

Nach Osborne's Untersuchungen sollten die Wickensamen dieselben Proteide enthalten mit Ausnahme von Vicilin. Falls dieses Proteid wirklich fehlen sollte, dürfte das aus Wicken gewonnene Globulin beim Erwärmen nicht coagulieren. Diese Angabe Osborne's kann ich aber nicht bestätigen, indem das von mir dargestellte Globulin beim Erwärmen Ausscheidungen gab, die allerdings lange nicht so bedeutend waren wie bei Lupinen- und Erbsenglobulin. Es wurde daher versucht, wie sich das Globulin bei der fractionierten Fällung verhielt. Der grösste Teil davon wurde schon durch Verdünnen der Salzlösung auf 2% gefällt. Die nächsten Fractionen fielen viel spärlicher aus wie bei Erbsen. Aber trotzdem konnten auch aus Wicken durch wiederholtes Fractionieren verschieden lösliche Globuline dargestellt werden, die vollständige Übereinstimmung mit den entsprechenden Fractionen der Lupinen und Erbsenproteide besassen. Sie zeigten die Zerlegbarkeit in Casein und Heteroalbumose und zwar mit Zunahme der Löslichkeit eine rasche Abnahme des Gehaltes an Heteroalbumose. Die nach längerem Dialysieren der Auszüge noch gelösten Eiweisskörper, die Albumine oder Osborne's Legumelin, konnten entweder durch Kochen oder Spuren von Säuren ausgeschieden werden und zeigten dann das Verhalten von Caseinen.

Die Reindarstellung von Casein und Heteroalbumose aus Wicken zu Analysenzwecken schien unmöglich; denn ein roter Farbstoff, der sich durchaus nicht entfernen liess, verunreinigte sie. Das Eiweiss behielt getrocknet ein braunes Aussehen. Es beweist dies wieder, wie schwierig es ist, reine Eiweisskörper zu erhalten. Zufällig kann man Farbstoffe als Verunreinigung leicht erkennen. Mit wieviel anderen farblosen oder wenig gefärbten Substanzen kommt aber das Eiweiss bei solchen Pflanzenauszügen in Berührung, die Gelegenheit bieten, ebenso schwer zu entfernende Verunreinigungen zu bilden wie die Farbstoffe. Die Elementaranalyse dieser Wickenproteide gab folgende Werte:

	Casein	Heteroalbumose
Kohlenstoff	53,0	49,7
Wasserstoff	7,2	7,0
Stickstoff	16,1	18,0
Schwefel	0,5	0,4
Phosphorsäure	0,2	0,3
Sauerstoff	23,0	24,6

Die Analysen der Wickenproteide stimmen mit denen der Erbsen ziemlich überein.

Aus den Untersuchungen der Wicken geht ebenfalls hervor, dass die Globuline eine Mischung vieler homologer Körper sind. Wenn nun Osborne bei der Untersuchung der Wicken keine bei 95—100° coagulierende Globuline gefunden hat im Gegensatz zu mir, so beweist dies, dass ein und dieselbe Pflanzenart durchaus nicht immer dieselben Homologen der Globuline erzeugen muss, sondern dass wechselnde Bedingungen auch verändernd auf die Proteide wirken werden.

Nach den Untersuchungen der Eiweisskörper der Lupinen, Erbsen und Wicken wurden noch die Bohnen einer näheren Prüfung unterzogen und zwar wurde eine rot blühende Varietät gewählt. Nachdem daraus nach der früher ange-

führten Methode das Globulin erhalten war, wurde es nach Wiederauflösung in Salzwasser einer fractionierten Fällung unterworfen. Dabei wurde im Gegensatz zu den andern Samen eine grosse Menge sehr leicht löslicher Fractionen erhalten. Die in 1% Salzbrühe sehr leicht löslichen Globuline zeigten einen raschen Zerfall unter Abscheidung von Caseinen. Der Heteroalbumosengehalt dieser Fractionen war sehr gering. Die schwer löslichen Fractionen dagegen hatten wieder mehr Vitellincharakter und lieferten auch daher mehr Heteroalbumose. In Bezug auf die Albumine herrschte ebenfalls völlige Übereinstimmung mit denen der bisher untersuchten Samen. Die Caseine zeigten eine kleine Abweichung von denen der vorher untersuchten Samen, indem sie in 3% Salzsäure noch teilweise löslich waren. Es bedurfte einer bedeutend stärkeren Salzsäure, mindestens 5%, um sie von der Heteroalbumose zu trennen.

Die Analysen des Caseins und der Heteroalbumose ergaben folgende Zahlen:

	Casein	Heteroalbumose
Kohlenstoff	52,6	49,9
Wasserstoff	7,2	7,0
Stickstoff	15,7	17,7
Schwefel	0,7	0,5
Phosphorsäure	0,3	0,6
Sauerstoff	23,5	24,3

Bei dem Casein der Bohnen konnte ausser der Differenz der Elementaranalysen auch zum ersten Male ein äusserlicher Unterschied von den Caseinen der anderen Samen constatiert werden durch seine teilweise Löslichkeit in 3% Salzsäure. Dieser eine Unterschied spricht dafür, dass auch die aus den andern Samen dargestellten Caseine und Heteroalbumosen trotz ihrer Ähnlichkeit nicht vollständig identisch sind, sondern durch Reactionen kaum zu unterscheidende Glieder homologer Reihen darstellen.

Diese Arbeit, die sich mit den Eiweisstoffen einiger Leguminosensamen beschäftigte, lässt es fast mit Sicherheit erscheinen, dass die der übrigen Samen dieser Pflanzenfamilie dasselbe Verhalten zeigen. Dass ferner die übrigen pflanzlichen Globuline und Albumine mit denen der Leguminosensamen grosse Ähnlichkeit zeigen werden, ist sehr wahrscheinlich. Durch diese Arbeit erscheinen aber auch ganz neue Gesichtspunkte für die tierischen Eiweisskörper. Falls durch weitere Untersuchungen diese Vermutungen sich bestätigen sollten, so wäre die Unübersichtlichkeit der Eiweisskörper bedeutend gemindert, und würde die Eiweisschemie vereinfacht in einem ganz anderen Lichte erscheinen.

Zum Schlusse dürfen folgende Ergebnisse zusammengefasst werden:

Der stets die pflanzlichen Eiweisskörper begleitende Phosphor ist ein wesentlicher Bestandteil davon und rührt teils von Lecithin, teils von Nuclein her. Das Lecithin geht eine mehr oder weniger feste Verbindung mit Eiweiss ein.

Die pflanzlichen Globuline werden durch verschiedene Einflüsse in phosphorhaltige Albuminate oder Caseine und in Heteroalbumose gespalten.

Die anorganischen Basen spielen eine wichtige Rolle bei den nativen Eiweisskörpern.

Die pflanzlichen Globuline muss man als salzartige Verbindungen zwischen anorganischen Basen und einem Eiweiss von sauerem Charakter auffassen, das, von den Basen befreit, sofort in Casein und Heteroalbumose zerfällt.

Ebenso sind die pflanzlichen Albumine salzartige Verbindungen zwischen Basen und einem saueren Eiweisskörper, der, von den Basen befreit, Casein bildet.

Die Globuline der Leguminosensamen sind Gemische unbestimmbar vieler einander sehr ähnlicher Proteide. Diese gehören einer homologen Reihe an, deren Anfangsglied die Heteroalbumose, die Zwischenglieder die Globuline und die Endglieder die Albumine sind.

Die Zersetzungsproducte des Caseins und der Heteroalbumose zeigen sehr grosse qualitative und quantitative Verschiedenheiten; aber trotz der Gegensätze konnte in beiden Histidin, Arginin und Lysin nachgewiesen werden, die drei für den Protaminkern charakteristischen Basen.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, an dieser Stelle meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Hofrat Prof. Dr. Hilger für die wohlwollende Unterstützung, die er mir bei Ausführung dieser Arbeit entgegenbrachte, meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.